

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : **02-154695**

(43)Date of publication of application : **14.06.1990**

(51)Int.CI.

C12P 21/08
A61K 39/395
C07K 15/28
C12N 5/16
C12N 15/06
G01N 33/53
G01N 33/566
G01N 33/577
//(C12P 21/08
C12R 1:91)

(21)Application number : **01-064016**

(71)Applicant : **F HOFFMANN LA ROCHE AG**

(22)Date of filing : **17.03.1989**

(72)Inventor : **BROCKHAUS MANFRED
LOTSCHER HANSRUEDI DR**

(30)Priority

Priority number : **88 8806339** Priority date : **17.03.1988** Priority country : **GB**

(54) MONOCLONAL ANTIBODY

(57)Abstract:

PURPOSE: To synthesize a monoclonal antibody or its biologically active fragment on the receptor for human tumor necrosis factor (hTNF-R) by selecting a hybridoma cell line secreting this antibody through a proper analytical system.

CONSTITUTION: A hybridoma cell strain secreting the antibodies is selected by means of a proper analytical system to synthesize a monoclonal antibody to the receptor for hTNF or its biologically active fragment. The monoclonal antibody or its biologically active fragment preferably has the activity of EC50 (the concentration of the Mabs where 5% TNF as % of the control is still bound to the tested cells) of down-modulation of 100 ng/ml or less on HL60 cells. The monoclonal antibody, when desired, non-toxic, inactive and therapeutically acceptable carrier are used to prepare its pharmaceutical composition.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑭公開特許公報(A) 平2-154695

⑮Int.Cl.⁵

C 12 P 21/08

識別記号

庁内整理番号

⑯公開 平成2年(1990)6月14日

8214-4B

8717-4B

8515-4B

C 12 N 15/00

5/00

C

B※

審査請求 未請求 請求項の数 23 (全11頁)

⑭発明の名称 モノクローナル抗体類

⑬特 願 平1-64016

⑭出 願 平1(1989)3月17日

優先権主張 ⑬1988年3月17日 ⑭イギリス(GB)⑬8806339

⑭発明者 マンフレート ブロット スイス国 ベツチングン, タルベツク29
クハウス⑭発明者 ハンスルエジ レチエ スイス国 メーリン, リーテネンベツク61
ル⑭出願人 エフ・ホフマン・ラ・
ロシュ・ウント・コン
バニー・アクチエンゲ
ルシャフト⑭代理人 弁理士 平木 祐輔
最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

モノクローナル抗体類

2. 特許請求の範囲

1. ヒト腫瘍壞死因子(hTNF-R)のためのレセプターに対するモノクローナル抗体またはその生物学的に活性な断片。
2. IgMまたはIgGサブタイプである請求項1に記載の化合物。

3. HL60細胞上で、ダウンモジュレーションEC₅₀が100ng/mlに等しいかまたはそれ以下である請求項1ないし2の少なくとも一つに記載の化合物。

4. HL60細胞上で、ダウンモジュレーションEC₅₀が約20ng/mlである請求項3に記載の化合物。

5. HL60細胞上で、ダウンモジュレーションEC₅₀が10μg/mlに等しいかまたはそれ以下である請求項1ないし2の少なくとも一つに記載の化合物。

6. HL60細胞上で、ダウンモジュレーションEC₅₀

が約2μg/mlである請求項5に記載の化合物。

7. HEp-2細胞上で、ダウンモジュレーションEC₅₀が100ng/mlに等しいかまたはそれ以下である請求項1ないし2の少なくとも一つに記載の化合物。

8. HEp-2細胞上で、ダウンモジュレーションEC₅₀が20-100ng/mlの範囲にある請求項7に記載の化合物。

9. HEp-2細胞上で、ダウンモジュレーションEC₅₀が2μg/mlに等しいかまたはそれ以下である請求項1ないし2の少なくとも一つに記載の化合物。

10. ダウンモジュレーションEC₅₀が約2μg/mlである請求項9に記載の化合物。

11. ダウンモジュレーションEC₅₀が約100ng/mlである請求項9に記載の化合物。

12. マウス細胞上で、ダウンモジュレーションを起こさない請求項1ないし11の少なくとも一つに記載の化合物。

13. WEHI-164細胞上で、ダウンモジュレーション

- を起こさない請求項1ないし12の少なくとも一つに記載の化合物。
14. 請求項1ないし13のいずれかの一つに記載の化合物の完全な抗原結合能を有する断片。
 15. 請求項1ないし13の少なくとも一つに記載のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞系。
 16. 治療的に活性な物質としての請求項1ないし14の少なくとも一つに記載の化合物。
 17. 診断用道具としての請求項1ないし14の少なくとも一つに記載の化合物。
 18. ヒトTNFレセプターの精製のための請求項1ないし14の少なくとも一つに記載の化合物。
 19. 適当な分析系により該抗体類を分泌するハイブリドーマ細胞系を選別することを特徴とする請求項1ないし13の少なくとも一つに記載の化合物の製造方法。
 20. 請求項1ないし14の少なくとも一つに記載の化合物および所望により非毒性、不活性な治療的に許容しうる担体物質を含有する医薬組成物。
 21. 種々の疾患、特に敗血症の診断または治療用の医薬的に活性な物質の調製における、請求項1ないし14の少なくとも一つに記載の化合物の使用。
 22. ヒトTNFレセプターの精製のための請求項1ないし14の少なくとも一つに記載の化合物の使用。
 23. 請求項19の方法によって製造された場合における請求項1ないし13の少なくとも一つに記載の化合物。

3. 発明の詳細な説明

腫瘍壞死因子(Tumor Necrosis Factor(TNF))は、例えばエンドトキシンの様な外部刺激物に対する応答において、活性化マクロファージにより放出される蛋白質である。それは、最初はバチルスカルメッテーグエリン(Bacillus Calmette-Guerin)および細菌性エンドトキシンにより処理されたマウスの血清中に見出された。そのインビボにおける特徴的な効果は、実験的な動物腫瘍類中に壞死を生ずることである(Carswell,E.A.ら

の(1975), Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 72, 3666; Matthews,N.およびWatkins,J.Pの(1978), Br.J.Cancer, 38, 302; Matthews,N.の(1978), Br.J.Cancer, 38, 310)。それは、インビトロでの腫瘍細胞の障害(Old,L.J.の(1985), Science 230, 630)、リポプロテインリバーゼ活性の阻害(Beutler,B.およびCerami,A.の(1987), New Engl.J.Med. 316, 379)、動物におけるエンドトキシンのある種の致死的効果の仲介(Beutler,B.らの(1985)Science, 229, 869)、顆粒細胞類および線維芽細胞類の刺激(Old,L.J.の(1985), Science, 230, 630; Beutler B.およびCerami,A.の(1987), New Engl.J.Med. 316, 379; Vilcek,J.らの(1986), J.Exp.Med. 163, 632)、内皮細胞の損傷(Sato,M.らの(1986), J.Natl.Cancer Inst. 76, 1113)、骨吸収(Bertolini,D.R.らの(1986), Nature 319, 516)、抗ウイルス活性(Mestan,J.らの(1986), Nature 323, 816; Wong, G.M.W.およびGoeddel,D.V.の(1986), Nature 323, 819)およびマラリア寄生虫に対する細胞毒性効果(Taverne,J.らの(1984), Clin.Exp.Immunol. 57,

293)を含む他の実験系における種々の生物学的効果を有している。これらの効果のいくつかは、多分、他の分泌因子の誘導により仲介されているであろう。該TNFの効果は、インターフェロン- γ 、インターロイキン-1および細胞性リポボリサッカライド類(LPS)により部分的に相乗効果を受けている。

マクロファージまたは単球-産生TNFは、またリノホトキシンと称されている密接に関連したリンパ球-産生物であるTNF- β と区別するために、TNF- α またはカケクチンとも称されている(Pennicaらの(1984), Nature 312, 724)。ヒトTNF- α およびTNF- β の両者は、クローン化され、E.coli中で発現されて対応する蛋白質類が大量に入手可能となる(Pennica,D.らの上記文献参照; Shirai,T.らの(1985), Nature 313, 803; Wang,A.M.らの(1985), Science 238, 149; Grayらの(1984), Nature 312, 712)。蛋白質配列レベルにおけるTNF- α とTNF- β との構造的比較は、30%の相同性を示す(Pennicaらの上記文献参照)。Pennica

ら(1984)およびGrayら(1984)によれば、両TNF類は、区別がつかない生物学的活性を有し、かつ同じ細胞表面レセプター(TNF-R) (Aggarwal, B.B. らの(1985), *Nature* 318, 665) または該細胞内の区画へのTNF信号の導入に対して応答可能と考えられているレセプター複合体に対して結合する。細胞類は、組換えTNFに対して高い親和性 (K_d : 0.1 ~ 1 nMまで) を有する細胞あたり5000の範囲の結合部位を有している [Tsujimoto, M. らの(1985), *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 82, 7626; および Baglioni, C. らの(1985), *J.Biol.Chem.* 260, 12295 ならびにその他]。該細胞表面レセプターに結合した後、TNFは速く該細胞により内在化される [Tsujimoto, M. らの上記文献参照、およびShalaby, M.R. らの(1987), *J.Leukocyte Biol.* 41, 196]。TNF結合蛋白質一または推定される TNF-レセプター複合体の少なくとも一部は、 125 I標識TNFを用いた化学的交差結合研究により同定されている。それは、70~80 kDの分子として記述されている [Kull, F.C. らの(1985), *Proc.Natl.Acad.Sci.U.*

S.A., 82, 5756 およびTsujimoto, M. らの上記文献参照]。より高い分子量の他の蛋白質類もまた、TNFに対して交差結合することが記述されている [Creasey, A.A. らの(1987), *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84, 3293]。これらの蛋白質類は、推定されるレセプター複合体の一部または、单一のレセプター蛋白質の翻訳後修飾の生成物類であろう。

TNF- α は、ヒトにおける膿膜炎菌血症による敗血症 [Waage, A. らの(1987), *Lancet*, 2月14日, 355]、寄生虫性疾患 [Scuderi, P. らの(1986), *Lancet*, 12月13日, 1364]、マウスにおける細胞毒性T細胞の発生 [Ranges, G.E. らの(1987), *J.Exp.Med.* 166, 991]、自己免疫マウスにおける系統性腎炎の発生 [Jacob, C.O. およびMc Devitt, H.O. の(1988), *Nature* 331, 356]、マウスにおける移植片対宿主疾患 [Piguet, P.-F. らの(1987), *J.Exp.Med.* 166, 1280]、マウスにおける大脳性マラリアの発生 [Grau, G. らの(1987), *Science* 237, 1210] および川崎病 [Donald, Y.M. らの(1986), *J.Exp.Med.* 164, 1958] 等のヒトおよびマウスにお

ける多くの病的状況に関連していることが示されている。インスリン-依存性糖尿病を引き起こす膵臓ベーターカーネルの破壊 [Mandrup-Poulsen, T. らの(1987), *Acta endocrinologica* 115, Supplement 282, 40] のような異常状態において起こり得る役割は、TNF自体にも帰せられ、かつそれがインターロイキン-1分泌の活性化剤として機能することにも帰せられる。TNF- α は、ラットにおける [Tracey, K.J. らの(1986), *Science* 234, 470] およびヒビにおける [Tracey, K.J. らの(1987), *Nature*, 330, 662-664] エンドトキシン誘導ショックならびに寄生虫感染または新形成による懸液質 [Beutler, B. およびCerami, A. らの(1987), *New Engl.J.Medicine*, 316, 379により論評されている] に関連することが示されている。TNF- α およびTNF- β の病原性効果は、血管系における内皮細胞壁の損傷に対して少なくとも部分的にあると考えられている [Stolpen, A.H. らの(1986), *Am.J.P.* 123, 16] および [Pober, J.S. らの(1987), *J.Immunol.* 138, 3319]。さらに、好中球類の内

皮への付着性は、TNFにより著しく増大される [Cavender, D. らの(1987), *J.Immunol.* 139, 1855]。

本発明の目的は、ヒト腫瘍死因子に対する以下で称されるレセプター(hTNF-R)におけるヒト細胞表面TNF結合蛋白質に対するモノクローナル抗体類、その生物学的に活性な断片類（ここで断片類は、完全な抗原結合能を有することが好ましい）、前記抗体類を分泌するハイブリドーマ細胞株類、前記抗体類またはその断片類の調製方法、前記抗体類またはその断片類を含有する医薬組成物を提供すること、および、種々の疾患の処置もしくは診断における、または該hTNF-Rの精製における該抗体類もしくは断片類の使用を示すことにある。

本発明のモノクローナル抗体類は、次のようにして製造することができる。

抗原の調製に当って、顆粒球細胞類のようなTNF-Rを有するヒト細胞類、または、胎盤組織由来の細胞類、または腺癌のような細胞系由来の細胞類、例えばZR-75、MCF-7、HEp-2、リンパ腫またはエプスタインバール(Epstein Barr)ウイル

ス形質転換 B-細胞類が、細胞培養技術において一般的に知られている条件下で培養される。細胞類は、採取され、TNF-R類は、トリトンX114が特に好適であるトリトンまたはそれと同様な洗浄剤、および例えばPMSFのようなプロテアーゼ阻害剤の存在下で可溶化される。レセプター類の純いての精製は、例えば、イオン交換クロマトグラフィーゲル過または高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)のような種々のクロマトグラフィ手段により達成され、固体支持体に固定された該レセプター配位子に基づくアフィニティーコロマトグラフィーが、本発明の精製手段において好ましい。

このような精製抗原のマウス、ウサギ、ラット、ヒツジ等への注射により、ポリクローナル抗体類が該血清から得られ、またはモノクローナル抗体類は、このような免疫された動物からの抗体産生細胞を回収し、ミエローマ細胞 (PAI マウスミエローマ細胞が特に好ましい)との融合のような通常の方法で得られる該細胞を不滅化することによ

所望の抗体を分泌するハイブリドーマ類が、初期状態、例えば注射前に前処理されたマウス中に腹腔内に注射され得る。ほぼ100%までのモノクローナル抗体が、1匹のマウス内の腹水腫瘍により製造され得る。抗体類は、上述の方法を用いて、たとえばこのような腫瘍により生成された腹水液から精製され得る。

モノクローナル抗体類は、オーチターロニー(Ouchterlony)免疫分散などの知られた方法によりそれらのサブクラスに従って特徴付けることができる。本発明においては、2種類のモノクローナル抗体、すなわちハイブリドーマ細胞株htr-1cおよびhtr-2aにより分泌されたものがIgMサブタイプであり、3種類のモノクローナル抗体、すなわちハイブリドーマ細胞株htr-4a、htr-5aおよびhtr-9bにより分泌されたものが IgG1サブクラスであり、ならびに2種類のモノクローナル抗体、すなわちハイブリドーマ細胞株htr-6bおよびhtr-7bにより分泌されたものが IgG2bサブクラスであった。

り得ることができる。このようなハイブリドーマ培養物の上澄み液は、放射免疫または酵素免疫またはドット免疫結合試験、あるいは実施例5に記載のダウソジュレーション試験のような通常の方法により、または実施例4に詳細に記載されている捕捉試験によりモノクローナル抗体について選別される。この試験に使用される放射性ヨウ素化TNF- α は、例えば、クロルアミン-T(chloroamin-T)、ラクトバーオキシダーゼまたはボルトン-ハンター(Bolton-Hunter)法により、あるいは、以下の実施例4の記述に従って調製することができる。

モノクローナル抗体類は、ハイブリドーマ上澄み液から、例えばイオン-交換、蛋白質Aもしくは固体支持体に結合された抗-免疫グロブリン/抗体類上でのアフィニティーコロマトグラフィ、HPLC等のような通常のクロマトグラフィ手段により精製することができる。

この技術においてよく知られた方法に従って大量のモノクローナル抗体類を製造するためには、

本発明のモノクローナル抗体類は、ヒト細胞上の“ダウソジュレーション”により特徴付けられる。このダウソジュレーションの程度は、特定の細胞類上、特にHL-60 およびHEp-2 細胞類上で測定される。“ダウソジュレーション”なる用語は、以下の工程を意味する。本発明のモノクローナル抗体が生理学的条件下でTNF-Rを有する生細胞類に結合される場合には、該細胞類は、TNFを結合するそれらの能力をゆるめる。このことは、以下の実施例5において与えられる実験的条件の詳細な記述に基づき、添付されている図面と関連させてよりよく理解されるであろう。

第1図は、HL-60 [ATCC番号 CCL 240]細胞に対するTNF-結合のダウソジュレーションを示し、ここで“TNFの結合”は、TNF-R抗体類により処理されていない細胞類(“対照”)に結合した放射能の百分率としての $^{125}\text{I}-\text{TNF}$ の量を意味している。例えば“1E-09”は、使用されたモノクローナル抗体(mAb)の量を表し、ここで抗体のタイプは、下方の異なる記号によりその後方の抗体の特定の

名称と共に示されている。実施例5に記述された方法によると、懸濁液中に生育しているヒト細胞系は、TNF-結合のダウンモジュレーションについて試験され得る。“EC₅₀”は、対照に対する百分率として50%のTNFが、まだ該細胞類に結合されている場合の本発明のモノクローナル抗体の濃度を表している。

第2図は、付着性細胞類の細胞としてHEp-2細胞(ATCC番号 CCL 23)に対する同様な現象を表している。

本発明のモノクローナル抗体類は、第3図にWE HI-164細胞(ATCC番号 CRL 1751)について示されているマウス細胞においては、TNF-結合のダウンモジュレートを起さない。

第4図は、本発明のmAb類の特定の例(htr-1c、htr-2a、htr-4a、htr-5a、htr-6b、htr-7b、htr-9b)のHL-60細胞およびHEp-2細胞におけるダウンモジュレーションの程度と、L-929細胞(ATCC番号 CCL 1)上のダウンモジュレーションの無い場合との直接比較を示している。

16450)ならびにHoltmann, H. およびWallach, D. の [J. Immunol. (1987) 139, 1161] に、細胞内の信号伝達経路に関連する酵素に作用することが知られているある種のホルボルエステル類の投与により引き起こされたTNF-R類の“ダウンレギュレーション”として記述されている。

htr-1c、htr-2a、htr-4a、htr-5a、htr-6b、htr-7bおよびhtr-9bは、本発明において有用なハイブリドーマ細胞株類の特定の例である。これらは、Salisbury(英国)のヨーロピアン・コレクション・オブ・アニマル・セル・カルチャーズ [European Collection of Animal Cell Cultures(ECACC)] に1988年3月10日にブダペスト条約の条件のもとに以下のECACC寄託番号をもって寄託されている: htr-1cに対して88031001、htr-2aに対して88031002、htr-4aに対して88031003、htr-5aに対して88031004、htr-6bに対して88031005、htr-7bに対して88031006およびhtr-9bに対して88031007。

しかしながら、本発明は、これらの特定のハイブリドーマ細胞株類の使用に制限されるものでは

ダウンモジュレーションは、上述のようにすべてのヒト細胞類について測定され得る。好ましくは、このようなダウンモジュレーションは、HL-60細胞上において、このような細胞上で100ng/mlに等しいか、もしくは下まわるEC₅₀、またはより好ましくは約20ng/mlのEC₅₀を示す本発明のIgM抗体類を用いるか、あるいは、このような細胞上で10μg/mlに等しいかもしくは下まわるEC₅₀、またはより好ましくは約2μg/mlのEC₅₀を示す本発明のIgG抗体類を用いて測定される。他の好ましい実施態様においては、このようなダウンモジュレーションは、HEp-2細胞上において、このような細胞上で100ng/mlに等しいか、もしくは下まわるEC₅₀、またはより好ましくは20-100ng/mlの範囲のEC₅₀を示す本発明のIgM抗体類を用いるか、あるいはこのような細胞上で2μg/mlに等しいか、もしくは下まわる、例えば100ng/mlのEC₅₀を示す本発明のIgG抗体類を用いて測定される。ダウンモジュレーションは、また、Aggarwal, B.B. およびBessaiu, T.E. の [J. Biol. Chem. (1987), 262,

ないと理解されるべきである。

モノクローナル抗体類が、種々の用途のために修飾され、あるいはそれらの断片類を創製することができ、それらはまだ該抗原の結合を示すことは、この技術においてよく知られている。このような断片類は、例えば、ババイン、ペプシン等による抗体類の酵素的消化によって創製され得る。

本発明のモノクローナル抗体類は、TNF-Rの免疫マフィニティー精製のために使用され得る。従って、このような抗体類は、固体支持体に対し、この技術においてよく知られた方法、例えばセファローズ等のCNBr活性化アガロースに対する共有結合によって結合され得る。

更に、本発明のモノクローナル抗体類は、細胞表面上のTNF-R類および推定される可溶形態のTNF-R類の測定のための診断道具として使用され得る。TNF-R類を有する細胞は、培養物中または組織試料上に局在化され得る。このような用途のために、抗体類は、この技術においてよく知られている方法に従って、例えばケイ光染料、酵素(酵素結合

免疫吸着剤試験 (ELISA)] のような発色物質または放射性物質 [放射免疫試験 (RIA)] に結合される。

本発明のモノクローナル抗体類は、種々の疾患の治療において使用することができ、敗血症の治療に特に好ましい。前記抗体類は、必要ならば、他の薬学的活性物質および／または通常使用されている薬学的に許容し得る固体もしくは液体担体物質との組合せにおいて使用され得る。投与量および投与割合は、種々の疾患の臨床的治療において一般に使用されている抗体類の投与量および投与割合と同様にして選択され得る。本発明の抗体類に対する受容者の過敏化を減少するために、この技術において知られている方法に従って生成されるヒト／マウス由来のキメラ抗体類が使用され得る。

以上本発明を一般的に記述し、また同様のことが以下の実施例においても示されているが、これらは限定的に解釈されるものではない。

実施例 1

抗原(TNF-R)の精製

HL-60 細胞 (ATCC No.CCL 240) を、 2 g/l の NaHCO_3 を含有する RPMI 1640 培地 (GIBCO カタログ番号 074-01800) 中において生育させ、 $5\% \text{CO}_2$ 霧囲気中、 1.5×10^6 細胞/ ml の密度になるまで 5% 牛胎児血清を追加した。該細胞 (3×10^{10}) を PBS 中で洗浄し、 0°C において、該ペレットに 1% トリトン X114 および 1 mM PMSF を有する 100 ml の PBS を添加することによって溶解させた。該溶解物を、 0°C で 30 分間、 20000 g で遠心分離にかけ、上澄み液を、PBS で $1:10$ に希釈した。希釈した上澄み液を、 4°C で、 20 mg の組換えヒト TNF- α (Pennica, D. らの (1984), Nature 312, 724; Shirai, T. らの (1985), Nature, 313, 803; Wang, A.. M. らの (1985), Science 238, 194) が、製造業者の勧告に従って結合されている 2 ml のアフィゲル 10 (affigel 10) (Bio Rad カタログ番号 153-6099) を含有するカラムにかけた (流速: $0.2\text{ ml}/\text{分}$)。このカラムを 4°C 、流速 $1\text{ ml}/\text{分}$ で、第 1 回目に

0.1% のトリトン X114 を含有する 20 ml の PBS で、そして第 2 回目に 20 ml の PBS 単独で洗浄した。レセプターを、 22°C 、 $2\text{ ml}/\text{分}$ の流速で、 4 ml の 100 mM グリシン、 $\text{pH } 2.8$ 、 0.1% のデシルマルトシドを有するカラムから溶離させた。溶出液を、セントリコン 30 チューブ (Centricon 30 tube) (Amicon) 中で $10\text{ }\mu\text{l}$ に濃縮させた。

実施例 2

免疫化

$10\text{ }\mu\text{l}$ の濃縮された溶出液を、 $20\text{ }\mu\text{l}$ の完全フロイントアジュvant と混合した。 $10\text{ }\mu\text{l}$ の乳濁液を、Holmdahl, R らの ((1985), J. Immunol. Methods 83, 379) に記載されている方法に従って、0 日目、7 日目および 12 日目に、麻酔がかけられた Balb/c マウスの一方の後足の肉趾に注射した。

実施例 3

ハイブリドーマ細胞融合の調整

免疫化させたマウスを 14 日目に切開し、膝窩のリンパ節を取り出し、細かく切りビベッティングを繰返すことによって、 2 g/l の NaHCO_3 を含有

する Iscove の培地 (IMEM, GIBCO カタログ番号 074-2200) 中に懸濁させた。De St. Groth および Scheidegger (J. Immunol. Methods, (1980), 35, 1) の修飾方法に従って、 5×10^7 のリンパ節細胞を、対数関数的状態で増殖している 5×10^7 PAI マウスミエローマ細胞 (J.W. Stocker らの Research Disclosure, 217, 1982 年 5 月, 第 155-157 頁) と融合させた。該細胞を混合し、遠心分離によってペレットにし、更に室温でゆるやかな攪拌下 IMEM 中の 2.0 ml の $50\%(\text{v/v})$ ポリエチレングリコール中において再懸濁を行ない、10 分間のゆるやかな攪拌の間に、 10 ml の IMEM をゆっくり添加することによって希釈した。該細胞を遠心分離によってペレットにし 200 ml の完全培地 (IMEM + 20% 牛胎児血清、グルタミン (2.0 mM) 、ならびに $100\text{ }\mu\text{M}$ ヒポキサンチン、 $0.4\text{ }\mu\text{M}$ アミノブテリン、および $16\text{ }\mu\text{M}$ チミジン (HAT) を含有する $2\text{-メルカプトエタノール} (100\text{ }\mu\text{M})$) 中に再懸濁させた。この懸濁液を 10 枚の 96 穴の組織培養板に分散させ、 $5\% \text{CO}_2$ および 98% の湿度の霧囲気下、培地を変え

ることなく37℃で11日間培養した。

実施例4

hTNF-Rに対する抗原を分泌するハイブリドーマのためのスクリーニング

ハイブリドーマ培養物の上澄み液(100 μl)を、通常のアフィニティー精製されたウサギ抗マウスIg抗体(10 μg/ml PBS 4℃)で1夜被覆されたELISA板(Nunc)に移した。この上澄み液を、PBS中ににおける1% BSAおよび0.01%マウスIgの溶液に2時間後置きかえ、更に2時間培養した。5%の牛胎児血清および0.1%のアジ化ナトリウムが追加された50 μlの RPMI 1640培地中の 3×10^6 HL 60細胞を、1 μg/mlの TNF-αと共に37℃で1時間培養し、実施例1に述べられているのと同様にしてPBSで1回洗浄し、溶解し、遠心分離を行ない、そして希釈した。希釈された溶解物を、ELISA板(50 μl/穴)に移し、4℃で2時間培養し、更に4℃において、PBS中における0.1%のトリトンX114で4回洗浄した。実施例3中に述べたと同様にして生成させ、Bringman,T.S.らの((1987),

Hybridoma 6, 489)に述べられたと同様のELISAによって選択されたTNFに対するモノクローナル抗体を、Franker,P.J.およびSpeck,J.C.((1978), Biochem.Biophys.Res.Commun. 80, 849)によって公表された方法に従って、¹²⁵IおよびIodo-Gen(Pierce カタログ番号 28600)を用いて標識化した。1% BSAを用いてPBS中に 10^4 cpm/mlになるまで希釈された¹²⁵I-標識抗-TNF抗体(2000CI/mmol)を穴(100 μl)に添加し22℃で2時間培養した。これらの穴を、PBSを用いて広範囲に洗浄し、Dupont Chronex スクリーンによりKodak Xomat XR-5フィルム上で1夜を要してオートラジオグラフィにかけた。この分析において陽性シグナルによって選別されたハイブリドーマ類は、hTNF-RまたはTNFのいずれかに対し支配される抗体類を分泌する。該 hTNF-R抗体類は、ELISA板に塗られたTNFに結合できることおよび実施例5中に述べられたそれらの生物学的活性によって同定された。該抗体類の重鎖アイソタイプを、ヤギ抗マウスIgGアイソタイプまたは抗マウス

/IgMアイソタイプ特異的血清(Nordic)のいずれかを用いて Ouchterlony-アガロース板中の沈澱によって測定した。

実施例5

TNF-結合のダウンモジュレーション

5×10^6 HL 60細胞(実施例1)を、実施例1-4に従った方法によって得られたアフィニティー精製をしたモノクローナル抗体または1 ng/mlと10 μg/mlとの間の濃度範囲における無関係な特異性の対照抗体と共に完全 RPMI 1640培地内で培養した。37℃で1時間培養した後、該細胞を遠心分離によってペレットにし、0℃で、4.5 mlのPBSを用いて洗浄した。それらを、追加の0.1%のアジ化ナトリウムおよび¹²⁵I-標識TNF(10^6 cpm/ml)を含有する1 mlの完全RPMI 1640培地(実施例1)中に再懸濁させた。¹²⁵I-標識TNFは、PrakerおよびSpeck(実施例4)によって述べられた方法に従って、TNF、Iodo-Gen(Pierce カタログ番号28600)から得られていた。比放射能は、700CI/mmolであった。該細胞を、4℃で2時間培養し、ペ

レット化し、0℃で、1%のBSAおよび0.001%のトリトンX100(Fluka)を含有する4.5 mlのPBSを用いて4回洗浄した。細胞結合放射能を、ターシンチレーションカウンターで測定した。同様の実験において、以前に抗-TNFレセプター抗体で処理されていなかった細胞の細胞結合放射能は、 10000 cpm/ 5×10^6 細胞であることが測定された。同様のプロトコールを、付着細胞系の場合、遠心分離工程を省略してWEHI-164-、L929-およびHEp-2-細胞の分析に使用した。HL60-、HEp-2-、WEHI-164およびL929-細胞に関する該分析の結果は図1-4中に示されている。

実施例6

ババイン処理によるF_{ab}-断片の生成

75 mMリン酸ナトリウム、75 mM塩化ナトリウムおよび2 mM EDTA、pH 7.0、0.1 mMのババイン(Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG)中におけるモノクローナル抗体 "htr-9" (10 mg/ml)(実施例1-4に述べたと同様にして調製した)の溶液0.5 mlに60 mMシステインを含有する同一のリン酸

ナトリウム／塩化ナトリウム／EDTA緩衝液中における $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の酵素を含有する新たに調製した溶液を添加した。37°Cで1時間培養した後、水中におけるヨウドアセトアミド(1M)の新たに調製した溶液の $10\mu\text{l}$ を添加することによって反応を停止させた。該混合物を、暗所中室温で30分間保ち、トリス/HClの2M溶液の $60\mu\text{l}$ 、pH 8.0を添加した。次いでこの反応混合物を、200mMトリス/HCl、pH 8.0で予め平衡にした蛋白質G-セファロース4B(Pharmacia Uppsala、スエーデン)の1mlを含有する小さなカラムに通した。流出画分を集め、PBS、pH 6.8に対して透析し、 $400\mu\text{l}$ に濃縮した。この溶液を、TSK 3000(Pharmacia KLB Biotechnology AB, Uppsala、スエーデン)カラム上のHPLCによって更に精製して約50000 Da分子量の单一蛋白質種を得た。

実施例7

ババイン処理によるF_{ab}-断片の生成

$100\mu\text{l}$ の0.15M 塩化ナトリウム中における $100\mu\text{g}$ のペプシン(Merck, Darmstadt, FRD)を、 $100\mu\text{l}$

mM酢酸ナトリウム、pH 4.0 中におけるモノクローナル抗体 "htr-9" ($10\text{mg}/\text{ml}$) [実施例1-4に述べたと同様にして調製した]の溶液 0.5ml に添加した。該混合物を室温で24時間培養し、次いで200mMトリス/HCl、pH 8.0に対して透析し、実施例6に述べたと同様の蛋白質G-カラムを通過させた。流出画分(2ml)を、窒素ガスで清浄化させ、窒素ガス下、室温で4時間、ジチオスリートール(Sigma)の1M溶液 $40\mu\text{l}$ と共に培養した。該混合物を、PBS pH 6.8に対して透析し、濃縮し、実施例6において述べたと同様にしてHPLCによって更に精製した。

4. 図面の簡単な説明

第1図、HL-60細胞に対する本発明のモノクローナル抗体によるTNF結合のダウンモジュレーションの測定結果を示すグラフ、

第2図は、HEp-2細胞に対する本発明のモノクローナル抗体によるTNF結合のダウンモジュレーションの測定結果を示すグラフ、

第3図は、WEHI-164細胞に対する本発明のモノ

クローナル抗体によるTNF結合のダウンモジュレーションの測定結果を示すグラフ、ならびに

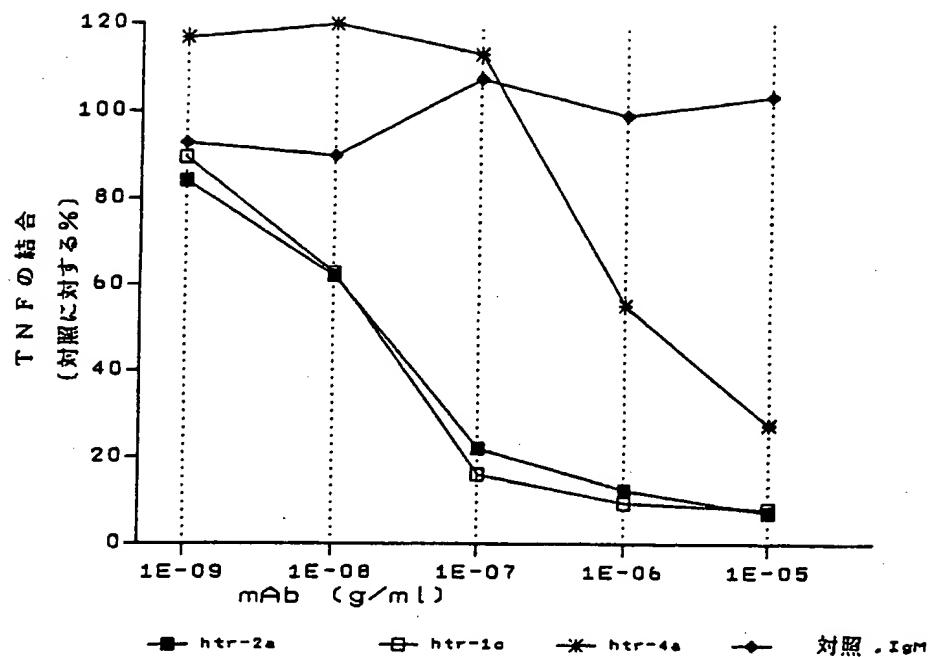
第4図は、HL-60細胞、HEp-2細胞およびL-929細胞に対する本発明のモノクローナル抗体によるダウンモジュレーションの程度の比較を示すグラフである。

出願人 エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・ウント・

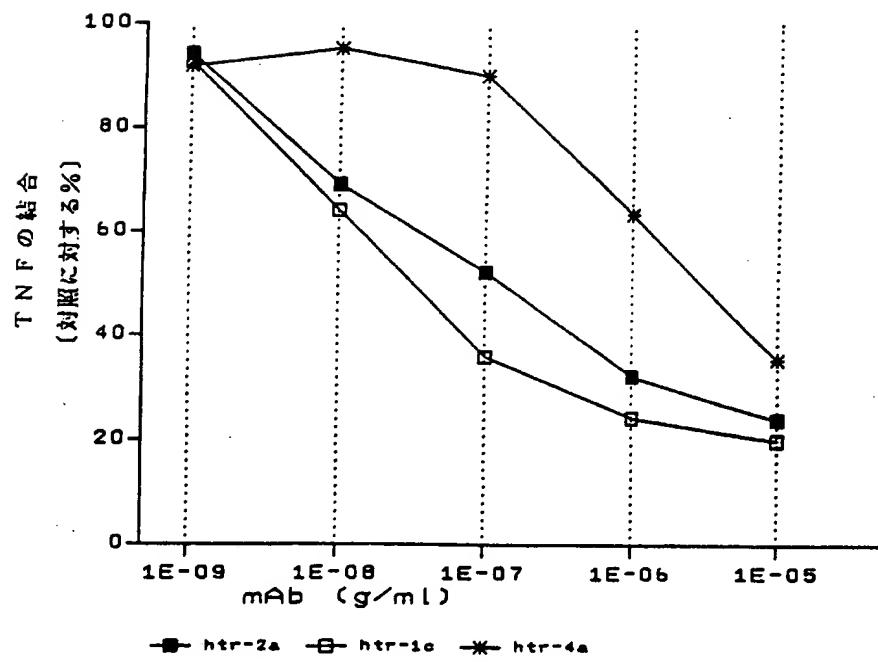
コンパニー・アクチエンゲゼルシャフト

代理人 弁理士 平木祐輔

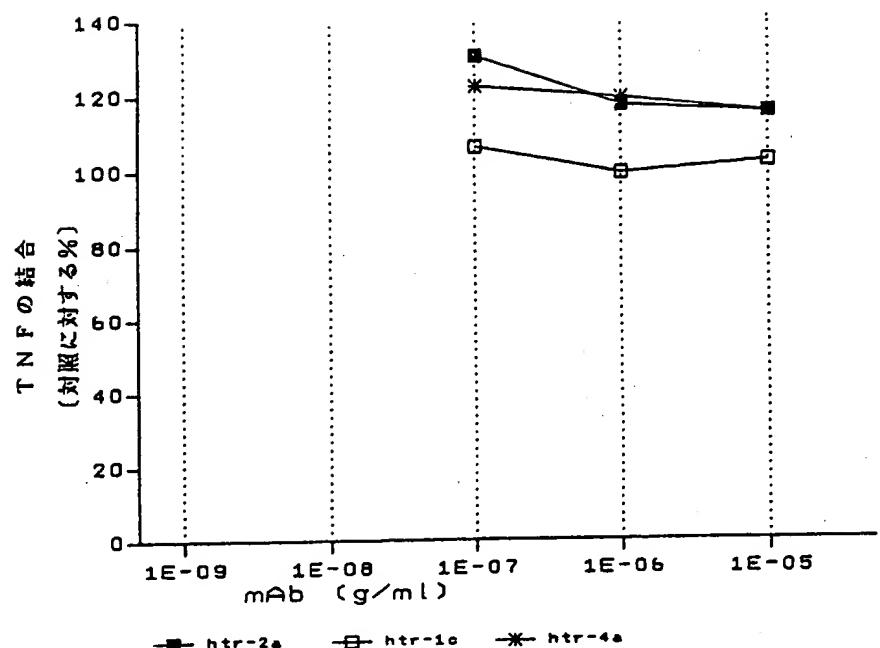
第 1 図



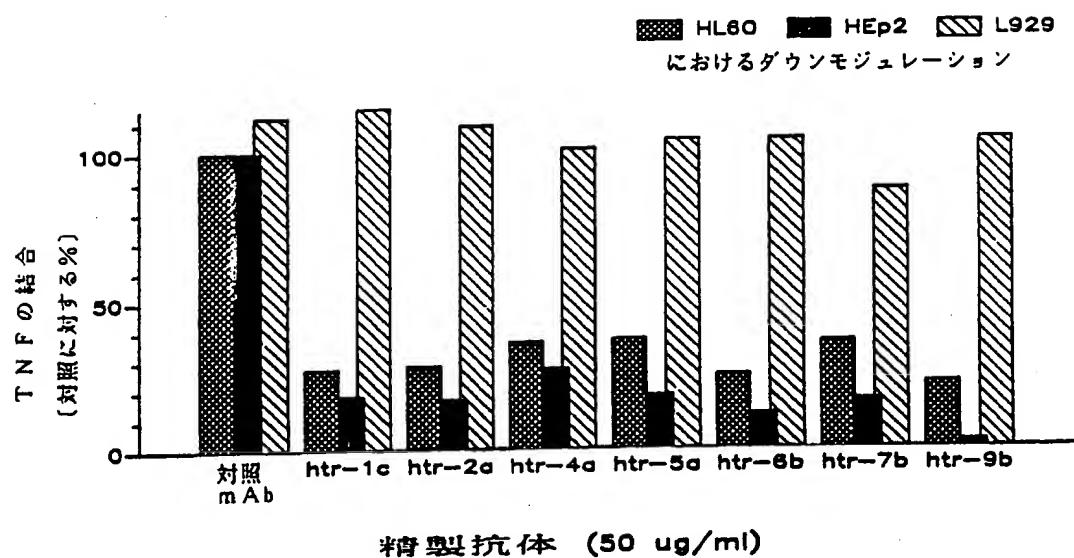
第 2 図



第3図



第4図



第1頁の続き

⑤Int.Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号
A 61 K 39/395	ADZ N	8829-4C
C 07 K 15/28		8318-4H
C 12 N 5/16		
	15/06	
G 01 N 33/53	D	7906-2G
	33/566	7906-2G
	33/577	7906-2G
//(C 12 P 21/08		
C 12 R 1:91)	B	